

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620081151615

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

朱黄青霉 α -1, 6-葡聚糖酶在毕赤酵母中的分泌表达

Expression of *Penicillium minioluteum* α -1, 6-dextranase in

Pichia pastoris

庄灵习

指导教师姓名: 姚 传 义 副教授

卢 英 华 教授

专 业 名 称 : 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 1 年 月

论文答辩日期: 2 0 1 1 年 月

学位授予日期: 2 0 1 1 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- () 2. 不保密，适用上述授权。

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
第一章 文献综述	1
1.1 葡聚糖简介	1
1.1.1 α -葡聚糖的致龋性	2
1.1.2 α -葡聚糖对制糖工业的不利影响	2
1.2 α -1,6-葡聚糖酶简介	5
1.2.1 α -1,6-葡聚糖酶的来源	5
1.2.2 α -1,6-葡聚糖酶的性质及作用	8
1.2.3 α -1,6-葡聚糖酶的研究进展	9
1.2.4 朱黄青霉来源的 α -1,6-葡聚糖酶	9
1.3 毕赤酵母表达系统研究进展	10
1.3.1 毕赤酵母简介	10
1.3.2 毕赤酵母表达外源蛋白优势	11
1.3.3 毕赤酵母表达外源蛋白的一般步骤	12
1.3.4 毕赤酵母表达宿主和载体	13
1.3.5 外源基因导入巴斯德毕赤酵母	14
1.3.6 影响外源蛋白高效表达的因素	16
1.3.7 外源蛋白表达的优化	18
1.4 本课题研究目的	21
第二章 α -1,6-葡聚糖酶表达载体的构建与鉴定	23
2.1 引言	23
2.2 实验材料及仪器	23
2.2.1 菌株与质粒	23
2.2.2 主要试剂与材料	24
2.2.3 主要仪器与设备	24
2.2.4 培养基和常用溶液	25
2.3 实验方法	26

2.3.1 目的基因扩增.....	26
2.3.2 琼脂糖凝胶电泳.....	27
2.3.3 PCR 产物的凝胶回收.....	28
2.3.4 酶切反应.....	29
2.3.5 目的片断和 pPIC9K 载体的连接反应	29
2.3.6 感受态细胞的制备.....	30
2.3.7 细菌的转化.....	30
2.3.8 重组质粒的提取.....	31
2.4 结果与讨论	32
2.4.1 目的基因 <i>dex</i>	32
2.4.2 重组质粒 pPIC9K- <i>dex</i>	33
2.5 小结	35
第三章 α-1,6-葡聚糖酶重组毕赤酵母的构建与表达	36
3.1 前言	36
3.2 实验材料与方法	36
3.2.1 主要仪器.....	36
3.2.2 主要试剂.....	36
3.2.3 常用培养基和溶液.....	37
3.3 实验方法	39
3.3.1 重组质粒的线性化.....	39
3.3.2 琼脂糖凝胶电泳、纯化.....	39
3.3.3 毕赤酵母 GS115 感受态的制备.....	39
3.3.4 毕赤酵母 GS115 的电转化.....	40
3.3.5 重组菌表型鉴定、基因拷贝数检测及 MM-蓝色葡聚糖 T2000 平板 筛选.....	40
3.3.6 重组酵母的 PCR 鉴定	41
3.3.7 重组毕赤酵母的产酶诱导.....	42
3.3.8 葡萄糖标准曲线的测定.....	42
3.3.9 α -1,6-葡聚糖酶活性测定	43

3.3.10 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	44
3.4 结果与讨论	45
3.4.1 转化子的显型鉴定	45
3.4.2 毕赤酵母重组菌拷贝数筛选	46
3.4.3 MM-蓝色葡聚糖 T2000 平板筛选	46
3.4.4 毕赤酵母重组菌基因组验证	47
3.4.5 重组毕赤酵母产酶诱导表达	48
3.5 小结	49
第四章 重组毕赤酵母发酵生产α-1,6-葡聚糖酶的优化	51
4.1 引言	51
4.2 实验材料与仪器	51
4.2.1 实验材料	51
4.2.2 实验所需主要药品与仪器设备	51
4.2.3 常用培养基及溶液	52
4.3 实验方法	52
4.3.1 菌种保藏技术	52
4.3.2 种子活化	52
4.3.3 酵母菌体干湿重测定	53
4.3.4 α -1,6-葡聚糖酶活性测定	53
4.3.5 重组酵母摇瓶培养条件优化	53
4.3.6 重组酵母的发酵罐培养技术	54
4.4 结果与讨论	55
4.4.1 酵母细胞干湿重关系	55
4.4.2 重组毕赤酵母摇瓶培养条件优化结果	56
4.4.3 重组酵母的发酵罐培养	62
4.5 小结	64
第五章 重组α-1,6-葡聚糖酶的酶学性质	65
5.1 前言	65
5.2 实验材料与仪器	65

5.2.1 实验材料.....	65
5.2.2 主要设备.....	65
5.2.3 主要试剂与溶液.....	65
5.3 实验方法	66
5.3.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性测定.....	66
5.3.2 最适反应温度和热稳定性测定.....	66
5.3.3 不同化学试剂中 α -1,6-葡聚糖酶活性的检测	66
5.3.4 重组 α -1,6-葡聚糖酶去糖基化及 SDS-PAGE.....	66
5.4 结果与讨论	67
5.4.1 最适反应 pH.....	67
5.4.2 α -1,6-葡聚糖酶的酸碱稳定性	67
5.4.3 最适反应温度.....	68
5.4.4 α -1,6-葡聚糖酶的热稳定性	69
5.4.5 化学试剂对酶活性的影响.....	70
5.4.6 重组 α -1,6-葡聚糖酶分子中的糖基化	71
5.5 小结	72
第六章 结论与展望	73
6.1 结论	73
6.2 展望	74
参考文献	75
附录 1	81
在读期间发表论文	82
致谢	83

CONTENTS

Abstract	i
Chapter 1 Literature review	1
1.1 Introduction of dextran	1
1.1.1 Problems caused by dextran in dental health.....	2
1.1.2 Problems caused by dextran in sugarcane factory.....	2
1.2 Introduction of α-1,6-dextranase	5
1.2.1 Sources of α -1,6-dextranase	5
1.2.2 Characteristics and applications of α -1,6-dextranase	8
1.2.3 Previous research on α -1,6-dextranase	9
1.2.4 α -1,6-dextranase from <i>Penicillium minioluteum</i>	9
1.3 Expression system of <i>Pichia pastoris</i>	10
1.3.1 Introduction of <i>Pichia pastoris</i>	10
1.3.2 Advantages of <i>Pichia pastoris</i>	11
1.3.3 Steps of foreign proteins expression by <i>Pichia pastoris</i>	12
1.3.4 Expression strains and vectors of <i>Pichia pastoris</i>	13
1.3.5 Introduction of foreign genes in <i>Pichia pastoris</i>	14
1.3.6 Factors affecting the expression of foreign proteins in <i>Pichia pastoris</i>	16
1.3.7 Optimization of foreign proteins expression	18
1.4 Objectives of this study	21
Chapter 2 Construction and identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i> vector for α-1,6-dextranase expression	23
2.1 Introduction	23
2.2 Materials and equipment	23
2.2.1 Strains and plasmid	23
2.2.2 Reagents.....	24
2.2.3 Equipment.....	24
2.2.4 Culture media and solutions.....	25

2.3 Experimental methods	26
2.3.1 Amplification of target gene	26
2.3.2 Agarose gel electrophoresis	27
2.3.3 Purification of PCR products	28
2.3.4 Restriction endonuclease reaction	29
2.3.5 Ligation of DNA fragment into pPIC9K	29
2.3.6 Preparation of competent <i>E. coli</i> cells	30
2.3.7 Transformation of recombinant plasmid into <i>E. coli</i>	30
2.3.8 Extraction of recombinant plasmid	31
2.4 Results and discussion	32
2.4.1 Target gene of <i>dex</i>	32
2.4.2 Recombinant plasmid pPIC9K- <i>dex</i>	33
2.5 Summary	35
 Chapter 3 Construction of recombinant <i>Pichia pastoris</i> for	
α-1,6-dextranase expression	36
3.1 Introduction	36
3.2 Materials and equipment	36
3.2.1 Equipment	36
3.2.2 Reagents	36
3.2.3 Culture media and solutions	37
3.3 Experimental methods	39
3.3.1 Linearization of recombinant plasmid	39
3.3.2 Purification of DNA after restriction endonuclease reaction	39
3.3.3 Preparation of competent <i>Pichia pastoris</i> GS115	39
3.3.4 Transformation of competent <i>Pichia pastoris</i> GS115	40
3.3.5 Phenotype identification, multi-copy selection of transformants and MM-blue dextran T2000 selection	40
3.3.6 PCR identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	41
3.3.7 Expression in recombinant <i>Pichia pastoris</i>	42

3.3.8 Determination of glucose standard curve	42
3.3.9 Determination of α -1,6-dextranase activity	43
3.3.10 SDS-PAGE electrophoresis	44
3.4 Results and discussion	45
3.4.1 Phenotype identification of transformants	45
3.4.2 Multi-copy selection of transformants	46
3.4.3 MM-blue dextran T2000 selection	46
3.4.4 Genome identification of transformants	47
3.4.5 Expression of α -1,6-dextranase in recombinant <i>Pichia pastoris</i>	48
3.5 Summary	49
 Chapter 4 Optimization of α-1,6-dextranase fermentation by	
recombinant <i>Pichia pastoris</i>	51
4.1 Introduction	51
4.2 Materials and equipment	51
4.2.1 Materials	51
4.2.2 Reagents and equipment	51
4.2.3 Culture media and solutions	52
4.3 Experimental methods	52
4.3.1 Storage of strains	52
4.3.2 Inoculum cultivation	52
4.3.3 Determination of dry/wet biomass	53
4.3.4 Determination of α -1,6-dextranase activity	53
4.3.5 Optimization for shake-flask cultivation conditions	53
4.3.6 Bioreactor cultivation conditions of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	54
4.4 Results and discussion	55
4.4.1 Correlation between wet and dry biomass	55
4.4.2 Optimization of shake-flask cultivation conditions	56
4.4.3 Cultivation of recombinant <i>Pichia pastoris</i> in bioreactor	62
4.5 Summary	64

Chapter 5 Enzymatic properties of recombinant α-1,6-dextranase	65
5.1 Introduction	65
5.2 Materials and equipment	65
5.2.1 Materials	65
5.2.2 Equipment	65
5.2.3 Culture media and solutions	65
5.3 Experimental methods	66
5.3.1 Determination of optimal pH and pH stability of α -1,6-dextranase	66
5.3.2 Determination of temperature and thermal stability of recombinant α -1,6-dextranase	66
5.3.3 Effect of chemical reagents on recombinant α -1,6-dextranase activity	66
5.3.4 Deglycosylation of recombinant α -1,6-dextranase and SDS-PAGE	66
5.4 Results and discussion	67
5.4.1 Optimum pH for enzymatic activity	67
5.4.2 pH stability of recombinant α -1,6-dextranase	67
5.4.3 Optimum temperature for enzymatic activity	68
5.4.4 Thermal stability of recombinant α -1,6-dextranase	69
5.4.5 Effect of chemical reagents on recombinant α -1,6-dextranase activity	70
5.4.6 Glycosylation in recombinant α -1,6-dextranase molecule	71
5.5 Summary	72
Chapter 6 Conclusions and recommendation	73
6.1 Conclusions	73
6.2 Recommendation	74
References	75
Appendix 1	81
Publications	82
Acknowledgements	83

摘要

α -1,6-葡聚糖酶是专一作用于葡聚糖中的 α -1,6-糖苷键的一类水解酶,能够降解葡聚糖产生异麦芽糖或异麦芽三糖以及分子量较小的葡聚糖,使其失去亲水性和粘性,广泛运用于医疗领域和制糖工业中。真菌生产的 α -1,6-葡聚糖酶在高温下有较好的稳定性,成为工业中 α -1,6-葡聚糖酶最主要的生产者。然而,天然菌株产酶量普遍较低,且纯化分离困难,无法满足实际应用。目前国内对葡聚糖酶的研究还处于初级阶段,本文的主要目的即通过基因工程及分子生物学方法,将朱黄青霉 α -1,6-葡聚糖酶基因导入毕赤酵母表达体系,以获得具有大规模工业生产价值的重组菌株,并研究重组菌种发酵所得 α -1,6-葡聚糖酶的酶学特性。

采用 PCR 法从朱黄青霉菌 (*Penicillium minioluteum*) C12114 中扩增出 α -1,6-葡聚糖酶基因 (*dex*),并在基因两端引入酶切位点 *EcoR* I / *Not* I,插入带有 AOX 启动子和 α -信号肽的表达载体 pPIC9K 的多克隆位点,构建出重组载体 pPIC9K-*dex*;经 *Sac* I 线性化重组载体后,通过电转化将其导入毕赤酵母 GS115,使外源基因整合到酵母染色体上;最终筛选出甲醇利用型 His^+Mut^+ ,其最高抗遗传霉素浓度为 1.5 mg/mL 约有 6 个拷贝数的重组 GS115/pPIC9K-*dex*。甲醇诱导重组菌表达 α -1,6-葡聚糖酶,对诱导的条件进行优化,确定诱导表达最佳条件为 pH 6.0,最适温度 30 °C,甲醇添加量为 1.5% (v/v)。通过 SDS-PAGE 及去糖基化对重组蛋白进行分析,得出分子量约为 80 kDa,由于糖基化作用,比理论分子量大了约 13 kDa。

利用 2.5 L 发酵罐进行重组毕赤酵母发酵优化。先以甘油为碳源,在甘油补加阶段,细胞干重达 54.8 g/L;甲醇诱导阶段,流加甲醇流速为 3.84 mL/(h·L),控制溶氧维持在 20%,诱导 138 h 后酶活达到最高值 60.28 U/mL,细胞干重 65.2 g/L。

其次还研究了 α -1,6-葡聚糖酶的酶学性质。该酶最适 pH 和温度为 pH 5.5, 50 °C,酸碱稳定性较好,但热稳定性较差。 CaCl_2 , MnSO_4 , CoCl_2 对 α -1,6-葡聚糖酶有激活作用,而 EDTA, CuSO_4 , MgSO_4 使酶活力降低。

关键词: α -1,6-葡聚糖酶; 毕赤酵母; 朱黄青霉; 诱导; 表达

Abstract

α -1,6-dextranase, which can specifically hydrolyze dextran by cutting off the α -1,6-glycosidic bond to release isomaltose, isomaltotriose and shorter saccharides of less hydrophilicity or viscosity, has been widely used in fields of clinics and sugar industry. Fungi are the most important commercial sources for production of dextranase as α -1,6-dextranase produced by them is thermostable. However, α -1,6-dextranase secreted by natural strains can not meet the growing demand, in views of both quantity and quality. So far, domestic study on α -1,6-dextranase is still in the threshold. Therefore, this work attempts to clone the α -1,6-dextranase gene from *Penicillium minioluteum* into *Pichia pastoris* through molecular biology and genetic engineering methods. Expression and properties of α -1,6-dextranase from this new recombinant strain would in turn be explored. It is expected that results of this study should be useful for large-scale production of α -1,6-dextranase in industry.

For this purpose, the gene of α -1,6-dextranase (*dex*) was amplified by PCR using *Penicillium minioluteum* C12114 genomic DNA as template at first. And then the amplified gene was inserted into pPIC9K containing AOX1 promotor and α -secreting signal peptides, and the recombinant plasmid pPIC9K-*dex* was linearized with *Sac* I, and transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. A His⁺Mut⁺ phenotype of recombinant *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-*dex* with the highest copies (6 copies) was screened under the G418 resistance concentration of 1.5 mg/mL. The optimal expression conditions of this positive transformant were thus determined as pH 6.0, cultivation temperature 30 °C, and with 1.5%(v/v) methanol induction. Due to the posttranslational modifications of *Pichia pastoris* expression system in amino acid (AA) sequence, the size of the recombinant α -1,6-dextranase was estimated as 80 kDa by SDS-PAGE analysis and deglycosylation method, which was about 13 kDa larger than the theoretical molecular weight.

Further, fermentation of α -1,6-dextranase by recombinant GS115/pPIC9K-*dex* was performed and optimized in a 2.5-L bioreactor. Glycerol was selected as the

carbon source. The dry cell weight reached 54.8 g/L at the end of the glycerol fed-batch phase. Once all the glycerol was consumed, the induction phase was started, and methanol was fed with a rate of 3.84 mL/ (h·L). The DO was maintained at 20% during the whole induction period. The highest α -1,6-dextranase activity was 60.28 U/mL after 138 h of methanol induction, and the dry cell weight reached up to 65.2 g/L.

Finally enzymatic properties of the recombinant α -1,6-dextranase were investigated. The optimum pH and temperature for enzyme activity were obtained as 6.0 and 50 °C, respectively. Moreover, the recombinant α -1,6-dextranase was found to be relatively stable in a wide pH range, whereas poor in the thermal stability. This enzyme could be activated by CaCl₂, MnSO₄, and CoCl₂, but inhibited by EDTA and CuSO₄ and MgSO₄.

Keywords: α -1,6-dextranase; *Penicillium minioluteum*; *Pichia pastori*; Induction; Expression

第一章 文献综述

1.1 葡聚糖简介

葡聚糖又称聚糊精，是以葡萄糖单体为组成的多糖的总称，属于多糖^[1]。葡聚糖由于 D-葡萄糖残基彼此间结合方式的不同以及聚合程度的不同，种类多样，分布广泛，如纤维素、淀粉、动物糖（糖原（Glycogen））、地衣多糖（Lichenin）等等。根据 O-配糖键类型的不同，葡聚糖可分为 α -葡聚糖和 β -葡聚糖两大类，键合方式多样，有 α -1,6、 α -1,4、 β -1,3、 β -1,4 等键型，表 1-1 为一些葡聚糖的类型及来源^[2]。葡聚糖制成的凝胶常用来进行生化分离，如柱层析。葡聚糖能刺激肠胃，以预防和改善便秘和肥胖，增加肠内的有用细菌群来改善肠内环境，排除肠内的有害物质，预防肠癌。葡聚糖按照组成它的单糖-葡萄糖的单元数目，分为葡聚糖 10 万，葡聚糖 14 万，葡聚糖 2 万等系列聚合物。

表 1-1 葡聚糖的类型及来源

Table 1-1 The type and source of glucan

结合类型	名称	来源
β -1,3/1,6	海带多糖	海草、菌类
β -1,4	纤维素	树
β -1,3	金藻昆布多糖	金藻门
	酵母多糖	酵母
β -1,6: β -1,3	香菇多糖	香菇
β -1,3/1,4	地衣多糖	地衣
α -1,4	直链淀粉	大米
α -1,4/1,6	糖原	动物
	直链淀粉	糯米
	普鲁兰多糖	酵母
α -1,6	右旋糖酐	乳酸菌肠系, 膜状白念珠菌

制糖工业中出现的葡聚糖主要是右旋糖酐 (Dextran)，它是一种完全由 α -D 吡喃葡萄糖单体构成的多糖。 α -葡聚糖中葡萄糖主要通过 α -1,6 糖苷键 (95%) 连接，还有少量的 α -1,2, α -1,3 和 α -1,4 糖苷键。 α -葡聚糖分子量可在数千至 700 万，在制糖工业上感兴趣的是分子量在 40000 以下的，因为这些能够通过制糖的过滤过程而走到煮糖结晶过程中。所以在制糖分析上，国际糖品分析统一方法委员会 (ICUMAS) 定以分子量 40000 者为标准葡聚糖^[3]。

近年来，各种多糖所具有的抗肿瘤、免疫、抗凝血、降血糖和抗病毒活性已相继被发现，展现出了良好的应用前景^[4]；且葡聚糖作为一种高分子聚合物，在医疗上可以代替血浆，控制药物释放。但是 α -葡聚糖也有很多副作用，如：食物中的葡聚糖，会与唾液中的糖蛋白形成牙菌斑，进而导致龋齿^[5]；利用葡聚糖用作代用血浆时，高分子量的葡聚糖对人体有毒性^[6]；在制糖、发酵和酿造过程中，葡聚糖的存在会影响产品的质量，增加工厂的能耗以及设备的耗损。因此如何在葡聚糖对生产造成危害时对其进行消除和减少，也是当今生产过程中要解决的一大问题。

1.1.1 α -葡聚糖的致龋性

口腔中致龋菌所生产的葡聚糖分为两类：一类是水溶性葡聚糖 (water soluble glucan, WSG)，其结构以 α -1,6 糖苷键为主，仅包括少量 α -1,3 糖苷键；另一类为非水溶性葡聚糖 (water insoluble glucan, WIG)，其结构以 α -1,3 糖苷键为主，仅包括少量 α -1,6 糖苷键^[7]。水溶性葡聚糖因其水溶性，易被一般口腔卫生措施清除。非水溶性葡聚糖，因其非水溶性和粘性，在致龋菌粘附、致密菌斑形成、阻碍菌斑中酸的扩散过程中发挥重要作用。

1.1.2 α -葡聚糖对制糖工业的不利影响

早在 1813 年，人们就注意到糖汁放置数日后，就会产生粘稠状物质，从而引起变质，1861 年，巴斯德 (Basteur) 指出这是由于微生物所引起，后来辛考夫斯基 (Cienkowski) 首次分离出菌种并将其命名为肠系膜状白念珠菌 (*Leuconostoc Mesenteroides*) ^[4]。

能生成葡聚糖的微生物种类很多 (见表 1-2)，其中制糖工业中常见的是肠系

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库